

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 9月 2日
Date of Application:

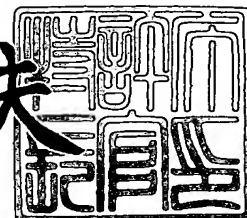
出願番号 特願2002-256691
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-256691]

出願人 独立行政法人食品総合研究所
Applicant(s):

2003年 8月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 P141287K

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 1 - 6 0 1 - 5 0 6

 【氏名】 町田 幸子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県土浦市乙戸南 1 丁目 5 - 3

 【氏名】 林 清

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 丁目 1 番地 2 7 0 4 棟 4 0 4 号

 【氏名】 徳安 健

【特許出願人】

 【識別番号】 501145295

 【氏名又は名称】 独立行政法人 食品総合研究所

 【代表者】 鈴木 建夫

【代理人】

 【識別番号】 100074077

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 久保田 藤郎

【選任した代理人】

 【識別番号】 100086221

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 裕也

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1



【包括委任状番号】 0105422

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 変性LDLなどの検出方法および検出用キット

【特許請求の範囲】

【請求項1】 受容体のリガンド認識に関係する領域を細胞もしくは試験管内で発現させて得た組換えタンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法。

【請求項2】 受容体のリガンド認識に関係する領域をビオチン化タンパク質として細胞もしくは試験管内で発現させた後、発現させたビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法。

【請求項3】 受容体のリガンド認識に関係する領域が、受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域である請求項1または2記載の検出方法。

【請求項4】 大腸菌内に蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成して得た再構成タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法。

【請求項5】 大腸菌内に蓄積した受容体のビオチン化細胞外領域またはビオチン化リガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成した後、再構成したビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法。

【請求項6】 受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、界面活性剤と環状糖質により正しい立体構造にリフォールディングして再構成タンパク質を得る請求項4または5記載の検出方法。

【請求項7】 分子間相互作用解析法による検出が、表面プラズモン共鳴または水晶発振子マイクロバランスによるものである請求項1～6のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 8】 受容体が、スカベンジャー受容体ファミリーである請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 受容体が、スカベンジャー受容体ファミリーに属するレクチン様酸化 LDL 受容体 (Lectin-like oxidized LDL receptor: LOX-1) である請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 受容体が、スカベンジャー受容体ファミリーに属するヒト由来のレクチン様酸化 LDL 受容体 (Lectin-like oxidized LDL receptor: LOX-1) である請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、CTAB、デオキシコール酸ナトリウム、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイドまたは SB3-14 である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】 環状糖質が、重合度 17 以上の高重合度シクロアミロースである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 13】 大腸菌内に凝集体として蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、界面活性剤と環状糖質により正しい立体構造にリフォールディングしたタンパク質を含むことを特徴とする変性 LDL、異常細胞または細菌の検出用キット。

【請求項 14】 大腸菌内に凝集体として蓄積した受容体のビオチン化細胞外領域またはビオチン化リガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、界面活性剤と環状糖質により正しい立体構造にリフォールディングしたタンパク質を、アビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化したものを含むことを特徴とする変性 LDL、異常細胞または細菌の検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、変性 LDL (Low Density Lipoprotein)、異常細胞並びに細菌の検



出方法並びに検出用センサー（キット）に関し、詳しくはスカベンジャー受容体のリガンド認識に係る領域を細胞もしくは試験管内で発現させた後、当該発現タンパク質を利用して変性LDL、異常細胞または細菌を検出する方法に関する。

より詳しくは、本発明は、スカベンジャー受容体の細胞外領域、並びにCタイプレクチン様領域をビオチン化タンパク質として大腸菌などの細胞または試験管内に発現させた後、不活性な凝集体であるビオチン化タンパク質の間違った構造を変性剤により解きほぐし、さらに界面活性剤と環状糖質により正しい高次構造にリフォールディングしたタンパク質を、アビジンやストレプトアビジン等を介して固相上に方向性を保って固定化したものを、分子間相互作用解析法、例えば表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランスなどの検出機器を用いる検出方法におけるセンサー部位（検出用センサー）として利用し、変性LDL、アポトーシス細胞などの異常細胞、または細菌などを検出する方法並びに検出用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内に蓄積した変性LDLやアポトーシス細胞や老化赤血球などの異常細胞、並びに生体内に侵入した細菌等を認識して結合する能力のある複数の受容体の存在が発見されている。

このような受容体の中には、認識する対象（リガンド）の認識に必要な領域が予想されているものも多い。これらの受容体そのもの、あるいは認識に必要な領域のみを利用すれば、リガンドである変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、細菌を簡便に検出できる可能性がある。

しかながら、受容体は膜タンパク質であるため、検出に使用可能なシステムを構築するためには、認識に必須の領域を可溶性タンパク質として得る必要がある。さらに、得られる可溶性タンパク質が、検出に利用可能なセンサーとして機能するための修飾がなされていることが望ましい。

【0003】

ところが、従来の方法では、先ず可溶性タンパク質を得ること自体が困難であ

った。最も簡便に効率的、かつ安価に可溶性タンパク質を得る方法は、遺伝子工学的手法により大腸菌を宿主として目的タンパク質を発現させることであるが、この方法では封入体と呼ばれる不活性な凝集体として菌体内に蓄積され、可溶性のタンパク質を得ることは不可能であった。

一方、動物細胞を宿主として可溶性タンパク質を得た例はあるが、これは大変な手間とコストを要する手法である。また、大腸菌内に蓄積した凝集物を可溶性の正しい構造にリフォールドしようとする試みもなされたが、いずれも煩雑な方法であり、かつ得られた可溶性タンパク質を検出系に使用するための適切な修飾がなされていた例はなかった。

【0004】

受容体を利用した変性LDLの定量法として、酸化LDL受容体の細胞外領域と免疫グロブリン重鎖の定常領域の一部からなる融合タンパク質を動物細胞により発現させ、これを免疫学的アッセイにより高感度に定量可能とした手法がある（特開2002-17353号公報）。しかし、より簡便に可溶性タンパク質を作製し、かつ検出に利用可能な手法は未だに提供されていない。

【0005】

また、酸化LDLのみを対象とした場合には、抗酸化LDL受容体が作出されていることから、ELIZA 法などを利用して、所定の時間をかけて実施すれば、検出は可能である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記の課題を解決した変性LDL、異常細胞並びに細菌の検出方法、好適には方向性を有した状態（リガンド結合部位が外側に位置するように）で固相上に固定化可能な可溶性のリガンド認識領域を大量に調製し、そのリガンド認識特性を活かしたセンサー部位を構築し、これを利用して変性LDLやアポトーシス細胞や老化赤血球などの異常細胞、並びに生体内に侵入した細菌等を検出する方法および検出用キットを提供することである。

【0007】

スカベンジャー受容体ファミリーに所属するレクチン様酸化LDL受容体（le



ctin like oxidized LDL receptor:LOX-1)の一つであるヒト由来のLOX-1 (hLOX-1 と略記する) は、動脈硬化や高脂血症などの疾患の引き金となると考えられている変性LDLの一つである酸化LDLを認識し、結合する。

さらに、アポトーシス細胞や老化赤血球などの異常な細胞、大腸菌 (*Escherichia coli*) やブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) などの食中毒や感染症の原因となり得る細菌を認識することが知られている。これらリガンドの認識と結合には、細胞外領域が関係していることが明らかである上、リガンド結合に必須の最小領域としてC-タイプレクチン様領域 (CTLDと略記することがある) が予想されていた。

【0008】

そこで本発明者らは、hLOX-1の細胞外領域もしくはCTLDをビオチン標識タンパク質として大腸菌内に凝集体として大量に蓄積させた後、変性剤により間違った構造を解きほぐし、さらに界面活性剤と環状糖質、例えば重合度17以上の高重合度シクロアミロース (以下、CAと略記することがある) によりリガンド認識能を有した正しい高次構造にリフォールドすることを検討した。

また、リフォールディングしたビオチン化受容体をアビジンもしくはストレプトアビジンを介して方向性を保った状態で固相上に固定し、例えば表面プラズモン共鳴や水晶発振子マイクロバランスなどの原理を利用した検出機器のセンサー部位として利用し、変性LDLや異常細胞、細菌を簡便に検出することを検討した。

その結果、前記したように変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、並びに細菌を簡便に検出することが可能であることを見出し、本発明に到達したのである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、例えば大腸菌内でビオチン化を受けるポリペプチドとの融合タンパク質としてhLOX-1の細胞外領域、並びにCTLDを大腸菌内に大量に蓄積した後、可溶性タンパク質として再構成し、これを変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、細菌などを検出するセンサー部位として利用することが可能な



ことを見出し、前記課題を解決した。

【0010】

第1の本発明は、受容体のリガンド認識に係る領域を細胞もしくは試験管内で発現させて得た組換えタンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法である。

第2の本発明は、受容体のリガンド認識に係る領域をビオチン化タンパク質として細胞もしくは試験管内で発現させた後、発現させたビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法である。

第3の本発明は、大腸菌内に蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成して得た再構成タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法である。

第4の本発明は、大腸菌内に蓄積した受容体のビオチン化細胞外領域またはビオチン化リガンド認識領域を正しい立体構造にリフォールディングして再構成した後、再構成したビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法である。

第5の本発明は、大腸菌内に凝集体として蓄積した受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、界面活性剤と環状糖質により正しい立体構造にリフォールディングしたタンパク質を含む変性LDL、異常細胞または細菌の検出用キットである。

第6の本発明は、大腸菌内に凝集体として蓄積した受容体のビオチン化細胞外領域またはビオチン化リガンド認識領域を変性剤により構造を解きほぐした後、界面活性剤と環状糖質により正しい立体構造にリフォールディングしたタンパク質を、アビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化したものを含む変性LDL、異常細胞または細菌の検出用キットである。

【0011】

【発明の実施の形態】

上記した本発明の態様について、詳しく説明する。

本発明は、hLOX-1の細胞外領域、もしくはリガンド認識領域（例えばCTL D）をコードする遺伝子を大腸菌内でビオチン化を受けるポリペプチドをコードする遺伝子とのキメラ遺伝子として大腸菌用の発現ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した後、ビオチン存在下の誘導条件で培養し、菌体内にビオチン化細胞外領域もしくはビオチン化CTL Dを不活性な凝集体として蓄積させた後、変性剤により間違った構造を解きほぐし、さらに変性状態にあるビオチン化タンパク質に、界面活性剤と環状糖質、例えば重合度が17以上の環状 α -1,4-グルカンを作用させることによりリガンド認識能を有した状態に変換し、アビジンもしくはストレプトアビジンを介して検出機器の特性に応じた固相上に固定化し、これを変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、並びに細菌を検出するセンサーとして利用する方法に関する。

【0012】

本発明の好適な実施形態においては、前記変性状態にあるビオチン化タンパク質は、微生物により不溶性の封入体として生産されたビオチン化スカベンジャー受容体細胞外領域であり、かつその不溶性の封入体の変性剤により可溶化されたものである。

さらに好適な実施形態においては、前記受容体細胞外領域は、ヒトhLOX-1の細胞外領域、もしくはCTL Dである。

本発明はまた、変性状態にあるビオチン化受容体に過剰量の界面活性剤を添加することにより、受容体を変性状態にしている物質を希釈すると共に、ビオチン化受容体同士の凝集を防ぎ、次いで重合度が17以上の環状 α -1,4-グルカンを添加し、その包接能を利用して前記界面活性剤を除き、ビオチン化受容体を正しい高次構造に戻し、リガンド認識能を有する正しい高次構造に戻し、センサーとして利用する方法に関する。

【0013】

本発明により、変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、細菌を簡便

に検出する方法、並びにそのための検出用センサーが提供される。

本発明の方法では、はじめに、受容体のリガンド認識部位に関する領域を細胞もしくは試験管で発現させる。ここで、受容体としてはLOX-1 などのスカベンジャー受容体ファミリーが挙げられる。また、リガンド認識部位に関する領域とは、細胞外領域およびリガンド認識領域、例えばCTLDを意味する。

かかる領域は、大腸菌、酵母などの微生物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞などの細胞もしくは試験管内で発現させる。

【0014】

受容体のリガンド認識に関する領域を細胞もしくは試験管内で発現させる場合、hLOX-1の細胞外領域、もしくはCTLDをコードするDNA断片をPCR法による常法によって調製する。その際に、それらの両端に、発現させる宿主の発現ベクターに応じた制限酵素サイトを付加する。例えば、大腸菌で発現させる場合は、5'側にNru I、3'側にEcoRVの制限酵素サイトを付加する。

PCR産物を抽出後、該当する組み合わせの制限酵素により処理した後、同様の制限酵素で処理済のクローニングベクターであるpBSに挿入し、遺伝子配列に誤りがないかDNAシーケンサーにより確認する。

続いて、配列を確認した当該タンパク質をコードした遺伝子を、該当する制限酵素により切り出し、発現ベクターの同様の制限酵素サイトに挿入する。ここで、発現ベクターとは、大腸菌の場合、大腸菌体内においてビオチン化を受けることが知られているポリペプチドをコードしているプラスミドベクター Pinpoint Xa (Promega 社製)である。次いで、発現宿主である大腸菌 JM109に形質転換した後、正しく目的遺伝子を取り込んだ形質転換体を選抜する。

【0015】

また、酵母の場合は酵母用の、昆虫細胞の場合は昆虫細胞用の、哺乳動物細胞の場合は哺乳動物細胞発現用のベクターを使用する。試験管内で発現させる場合は、コムギ胚芽系を利用する場合には、pEU3(TOYOBO 社製)を、Escherichia coli lysate を利用する場合には、pET28(Novagen 社製)を発現用ベクターとして使用することができる。

さらに、発現ベクター中に挿入する際には、ビオチン化を受けるポリペプチド



の配列を当該遺伝子配列の上流に入れ、ビオチン化ポリペプチドとの融合タンパク質として発現可能なようにする。

なお、ビオチン化に関しては、目的プラスミドにより形質転換された大腸菌 J M109 の 1 コロニーを最終濃度で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに $2 \mu\text{M}$ のビオチンを含む LB 培地 5 ml に接種し、 37°C で一晩攪拌しながら培養する。続いて、この培養液を最終濃度で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに $2 \mu\text{M}$ のビオチンを含む 50 ml の LB 培地に 0.5 ml 添加し、1 時間培養したのち、最終濃度で $100 \mu\text{M}$ になるように IPTG を添加し、目的融合タンパク質の発現を誘導し、さらに 4 時間攪拌しながら培養する。この操作により、目的とするタンパク質をビオチン化タンパク質として発現させることができる。

【0016】

大腸菌内に蓄積した受容体のリガンド認識に係る領域の再構成は、第 1 段階として、不溶性画分に回収された受容体の細胞外領域またはリガンド認識領域を、最終濃度で 40 mM の DTT を含む 6 M のグアニジン塩酸塩中で 1 時間処理し、間違った構造を解きほぐすことにより行う。続いて、第 2 段階として、70 倍容量の $0.05 - 0.1\%$ 界面活性剤溶液（最終濃度で 2 mM の DL-cystine を含む PBS 溶液）を添加し、室温で 1 時間反応させる。

この過程で、変性剤が希釈されると同時に、変性剤の希釈に伴う受容体同士の凝集は、添加した界面活性剤が受容体・界面活性剤複合体を形成することにより防止される。さらに、最終段階として、最終濃度で 0.6% になるように 3% の CA 保存溶液を添加し、室温で 1 時間反応させる。CA は、受容体・界面活性剤複合体から界面活性剤を剥離する。この過程で受容体は正しい立体構造にリフォールデベンゲされ、再構成受容体を得ることができる。

【0017】

前記で用いる変性剤としては、グアニジン塩酸塩、尿素などがあるが、間違った構造を完全に解きほぐす目的で、最終濃度で 6 M のグアニジン塩酸塩を一般に用いる。また、間違って形成されている S-S 結合を切断する目的で、変性剤溶液中には最終濃度で 40 mM の DTT を添加する。処理するタンパク質濃度は、 $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 程度である。封入体を PBS (－) に懸濁した後、最終濃度で 4

0 mMのDTTを含む最終濃度 6 Mのグアニジン塩酸塩を加え、室温で 1 時間反応させる。

【0018】

次に、正しい高次構造にリフォールディングする際に使用する界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルまたはスクロース脂肪酸エステル、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB)、デオキシコール酸ナトリウム、ミリスチルサルフォベタイン (SB3-14) 等が挙げられる。

界面活性剤を過剰量に添加することにより、ビオチン化タンパク質などを変性状態にしている物質を希釈すると共に、受容体同士の凝集を防ぐことができる。

また、環状糖質としては、前記したように、重合度が 17 以上の環状 α -1, 4-グルカンなどを挙げることができる。

【0019】

次いで、発現させたタンパク質を利用して酸化LDL等の変性LDL、アポトーシス細胞や老化赤血球などの異常な細胞、並びに細菌（例えば生体内に侵入した食中毒や感染症の原因となり得る細菌）を検出する。

検出に際しては、前記の検出用センサーを調製するが、本発明の変性LDL、アポトーシス細胞などの異常な細胞、細菌を検出するセンサーの調製方法の好ましい態様では、受容体のリガンド認識部位に関係する領域をビオチン化タンパク質として細胞もしくは試験管で発現させる。

【0020】

発現させたビオチン化タンパク質例えばhLOX-1の細胞外領域、CTLDを封入体として大腸菌内に蓄積させた後、上記したように、グアニジン塩酸塩などの変性剤を用いて間違った高次構造を解きほぐす。続いて、変性状態にあるビオチン化細胞外領域、並びにCTLDを過剰量の界面活性剤を添加することにより、ビオチン化タンパク質を変性状態にしている物質を希釈すると共に、受容体分子同士の凝集を防ぐ。

次いで、環状糖質、例えば重合度が 17 以上の環状 α -1, 4-グルカンを追加し、その包接能を利用して前記界面活性剤を除き、正しい高次構造にリフォー

ルディングし、リガンド認識能を有した状態に変換する。その後、アビジンもしくはストレプトアビジン等を介して方向性を保った状態でチップ、キュベット等の固相上に固定し、これをセンサーとして使用する。

【0021】

本発明者らは、目的とするセンサー部位を構築するに当たり、hLOX-1の細胞外領域、もしくはCTLDのみでも、変性LDL、異常細胞、並びに細菌などを結合し得ることを予想し、hLOX-1の細胞外領域、並びにCTLDを簡便、かつ安価に製造するための条件を確立した。

さらに本発明者らは、製造した領域がセンサー部位として汎用性に富むためには、タンパク質などの相互作用を解析する全システムにおいて、アビジンもしくはストレプトアビジンを介した固定化を利用することが可能なことに着目し、ビオチン化タンパク質として調製することが最良であると考えた。

【0022】

そこで、hLOX-1の細胞外領域、並びにCTLDをビオチン化タンパク質として発現可能な系として、ビオチン存在下において大腸菌内においてビオチン化を受けるポリペプチドとの融合タンパク質として発現させることを試みた。

その結果、いずれのビオチン化タンパク質も過剰発現は可能であるが、不規則な凝集体（封入体）として大腸菌体内に蓄積するため、リガンド認識能を有した状態にリフォールディングする必要があることが明らかとなった。

【0023】

そこで次の段階として、封入体を形成したビオチン化タンパク質のリフォールディングを試みたところ、人工シャペロン法により良好にリフォールディングされることが明らかとなった。

再構築したビオチン化細胞外領域、並びにビオチン化CTLDは、いずれもリガンド認識能が回復しており、センサーとして機能し得ることが示唆された。

【0024】

次に、再構築したビオチン化細胞外領域、並びにビオチン化CTLDが、実際にセンサー部位として機能し得るか検討するため、アビジンもしくはストレプトアビジンを介してリガンドとの結合を数値として捕えることが可能なシステムに固定



化した。そして、様々な種類のリガンドとの結合を検討した。

その結果、酸化LDL、アセチル化LDLの場合、 50 ng/ml (10^{-11} M) という低濃度でも十分に検出可能であることが明らかとなった。さらに、アポトーシス細胞、大腸菌 (*E. coli*)、ブドウ球菌 (*S. aureus*) 等の細菌の検出も可能であることが明らかとなった。

この検出方法に使用する検出機器としては、表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランスなど分子間相互作用解析に使用されている機器一般の適用が可能である。

【0025】

変性LDL、アポトーシス細胞等の異常な細胞、並びに細菌の検出を行う際には、先ずリフォールディングに成功したビオチン化領域、もしくはビオチン化CTL Dを定量的な検出が可能な装置のセンサー部位に固定化する。表面プラズモン共鳴の原理を利用した装置で検出する場合には、装置の挿入部位の形状に適したチップやキュベット上にストレプトアビジン、もしくはアビジンを介してリガンド認識領域が外側を向くように固定化する。水晶発振子マイクロバランスにより検出する場合は、装置への挿入が可能な水晶発振子上にストレプトアビジン、もしくはアビジンを介してリガンド認識領域が外側を向くように固定化する。

これらをそれぞれの検出機器に挿入し、変性LDL (酸化LDL、アセチル化LDL)、アポトーシス細胞 (HL 60をサイクロヘキシミドで処理することによりアポトーシスを誘導)、並びに細菌 (*E. coli*, *S. aureus*等) を流路に流したり、添加したりして、その結合を測定する。表面プラズモン共鳴の原理を使用した機器の場合、リガンドの結合に伴うセンサー表面の屈折率の変化 (レゾナンスユニット: RU) として検出することとなる。水晶発振子マイクロバランスの原理を使用した機器の場合、重量負荷が増大するため、振動数 (Hz) の減少として検出される。

【0026】

【実施例】

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 hLOX-1 のビオチン化細胞外領域、並びにビオチン化CTLDの発現

本実施例では、hLOX-1の細胞外領域、並びにCTLDをビオチン化タンパク質として発現させる手法について検討した。

(1) ビオチン化ポリペプチドとhLOX-1の細胞外領域、もしくはCTLDとの融合タンパク質発現系の構築

hLOX-1の細胞外領域、もしくはCTLDをコードするDNA断片はPCR法による常法により調製した。それらの両端には、5'側にNruI、3'側にEcoRVの制限酵素サイトを付加した。PCR産物を抽出後、両制限酵素により処理した後、クローニング用ベクターであるpBSに挿入し、遺伝子配列に誤りがないかDNAシーケンサーにより確認した。hLOX-1の細胞外領域の塩基配列を配列表の配列番号1に、hLOX-1のCTLDの塩基配列を配列表の配列番号2に、それぞれ示す。

配列を確認した当該タンパク質をコードした遺伝子を、制限酵素により切り出し、大腸菌内においてビオチン化を受けることが知られているポリペプチドをコードしているプラスミドベクターPinPoint Xa (Promega社製)の上記制限酵素サイトに挿入した。次いで、発現宿主である大腸菌 JM109に形質転換した後、正しく目的遺伝子を取り込んだ形質転換体を選抜した。

【0027】

(2) ビオチン化タンパク質の誘導方法

目的プラスミドにより形質転換された大腸菌 JM109の1コロニーを最終濃度で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに $2 \mu\text{M}$ のビオチンを含むLB培地 5 ml に接種し、 37°C で一晩攪拌しながら培養した。続いて、この培養液を最終濃度で $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、並びに $2 \mu\text{M}$ のビオチンを含む 50 ml のLB培地に1:100 (容量比)の割合で接種し、1時間培養した後、最終濃度で $100 \mu\text{M}$ になるようにIPTGを添加し、目的融合タンパク質の発現を誘導し、さらに4時間攪拌しながら培養した。

【0028】

(3) ビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTLDの検出と発現状態の確認

上記誘導処理後の培養液 $100 \mu\text{l}$ を 1.5 ml の遠心チューブに入れ、 $15,000 \text{ rpm}$ で数分間遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を超音波処理にて

破碎後、20,000 gで30分間遠心して得られた上清（可溶性画分）と沈殿（不溶性画分）をそれぞれSDSサンプルバッファーに懸濁し、95℃で4分間処理した。次いで、12%のSDS-PAGEにてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。

転写後のニトロセルロース膜は、ポンソーSによる染色で、タンパク質バンドの位置を確認した後、TBS-Tween（20 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.6、0.1% Tween20）中にて室温で穏やかに60分間攪拌した。次に、ストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼ中にて室温で30分間反応させた。続いて、反応後のニトロセルロース膜をTBS-Tweenにて洗浄した後、アルカリフォスファターゼの基質であるNBT/BCIP溶液を添加し、ビオチン化タンパク質のバンドが検出されるまで室温で反応させた。

その結果、不溶性画分には、ビオチン化細胞外領域、およびビオチン化CTLDの分子量に相当する位置にビオチン化タンパク質の顕著なバンドが検出された（図1）。

【0029】

実施例2 ビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTLDの可溶性タンパク質への再構成

大腸菌で発現させたビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTLDは、可溶性画分には存在せず、ほとんどが封入体として蓄積されていることが明らかとなった。そこで、封入体からビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTLDを人工シャペロン法によりリフォールディングすることを試みた。

封入体を最終濃度40 mMのDTTを含む6 Mのグアニジン塩酸塩溶液で室温にて1時間処理し、間違った構造を完全に解きほぐした。続いて、70倍容量の界面活性剤溶液（0.1% CTABもしくはSB3-14、最終濃度で2 mMのDL-cystineを含むPBS）を添加し、室温で1時間反応させた後、反応液24 mlを取り出し、3% CA溶液6 mlを加えさらに1時間室温で反応させた。

この溶液を20,000 gで10分間遠心し、得られた上清（可溶性画分）をリフォールディング溶液とした。ビオチン化細胞外領域、CTLDの存在を確認したところ、80%以上が可溶性画分に回収されていることが確認され、効率的にリ

フォールディングされていることが示された(図2)。

リフォールドされたビオチン化細胞外領域、ビオチン化CTLDをストレプトアビジンビーズ上に固定化し、リガンドの一つであるアセチル化LDLを蛍光標識したDiIAcLDLの結合を確認したところ、リフォールディングしたビオチン化細胞外領域、もしくはビオチン化CTLD領域を固定化したビーズ上に蛍光が観察され、どちらもリガンド結合能を回復していることが示された。

【0030】

実施例3

リフォールディングに成功したビオチン化細胞外領域、もしくはビオチン化CTLDを変性LDLなどを検出するセンサーとして使用する目的で、表面プラズモン共鳴により検出が可能な機器のセンサー部位へ各ビオチン化タンパク質を固定化し、実際のリガンドの結合を検討した。表面プラズモン共鳴装置としては、BIACORE社製のBIACORE、並びに日製産業株式会社製のIASysを使用した。

(1) 再構築ビオチン化細胞外領域をBIACOREのストレプトアビジンセンサーチップ上に、リガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。これをBIACORE本体に挿入後、変性LDL(酸化LDLおよびセチル化LDL)との結合を測定した。表面プラズモン共鳴の原理を利用した機器の場合、リガンドの結合をレゾナンスユニット:RUの増加として検出することになる。種々の濃度の変性LDLの結合を検討したところ、変性LDLの濃度が50 ng/ml (1.0×10^{-11} M)でも十分に検出可能であることが示された(図3)。

(2) 再構築ビオチン化受容体をIASysのビオチンキュベット上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。これをIASys本体に挿入後、変性LDL(酸化LDLおよびセチル化LDL)との結合を測定した。その結果、BIACOREで得られた結果と同様に、変性LDLの濃度が50 ng/ml (1.0×10^{-11} M)でも十分に検出可能であることが示された。

【0031】

(3) 再構築ビオチン化受容体をIASysのビオチンキュベット上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。こ

れを IAsys 本体に挿入後、細菌（大腸菌（*E. coli*）およびブドウ球菌（*S. aureus*））との結合を測定した。その結果、グラム陰性菌である大腸菌、並びにグラム陽性菌であるブドウ球菌のいずれも結合することが確認された。

（４）再構築ビオチン化受容体を IAsys のビオチンキュベット上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。これを IAsys 本体に挿入後、アポトーシスを誘導させた HL60 との結合を測定した。その結果、アポトーシスを誘導していない健康な HL60 は結合しないが、アポトーシス誘導細胞は結合することが確認された。

【0032】

実施例 4

リフォールディングに成功したビオチン化細胞外領域、もしくはビオチン化 CTLD を変性 LDL などを検出するセンサーとして使用する目的で、水晶発振子マイクロバランスにより検出が可能な機器のセンサー部位へ各ビオチン化タンパク質を固定化し、実際のリガンドの結合を測定した。装置としては、Initium 社製の Affinix Q を使用した。

（１）再構築ビオチン化受容体を水晶発振子上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。これを装置に挿入後、変性 LDL（酸化 LDL およびセチル化 LDL）との結合を測定した。その結果、変性 LDL の濃度が 50 ng/ml （ 10^{-11} M ）でも十分に検出可能であることが示された（図 4）。

【0033】

（２）再構築ビオチン化受容体を水晶発振子上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。水晶発振の原理を利用した機器の場合、リガンドが結合すると、重量負荷が増加するため、振動数（Hz）の減少として検出される。装置に挿入後、細菌（大腸菌（*E. coli*）およびブドウ球菌（*S. aureus*））との結合を測定した。その結果、グラム陰性菌である大腸菌、並びにグラム陽性菌であるブドウ球菌のいずれも結合することが確認された（図 5、6）。なお、図 5、6 中の矢印は細菌の添加時期を示す。

【0034】

(3) 再構築ビオチン化受容体を水晶発振子上に、ストレプトアビジンを介してリガンド認識に関わる部分が外側を向くように固定化した。これを装置に挿入後、アポトーシスを誘導させたHL60との結合を測定した。その結果、アポトーシスを誘導していない健康なHL60は結合しないにもかかわらず、アポトーシス誘導細胞は結合することが確認された(図7)。図7中の矢印はアポトーシス細胞の添加時期を示す。

【0035】

【発明の効果】

本発明により、生体内に蓄積した変性LDLやアポトーシス細胞、老化赤血球などの異常細胞、並びに生体内に侵入した細菌などを効率よく検出する方法が提供される。この方法は、スカベンジャー受容体のリガンド認識に関係する領域を細胞内もしくは試験管内で発現させて得た組換えタンパク質を利用して行うことができる。

さらに、本発明は、かかる変性LDL、異常細胞、細菌を検出するためのセンサー部位(検出用キット)を安価、かつ大量に供給することを可能にする。

【0036】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 独立行政法人 食品総合研究所

<120> 変性LDLなどの検出方法および検出用キット

<130> P141287K

<160>2

<170>

<210>1

<211>639

<212>DNA

<213>Homo sapience aortic endothelial cell

<400>1

```

tcc cag gtg tct gac ctc cta aca caa gag caa gca aac cta act cac 48
Ser Gln Val Ser Asp Leu Leu Thr Gln Glu Gln Ala Asn Leu Thr His
   1             5             10            15
cag aaa aag aaa ctg gag gga cag atc tca gcc cgg caa caa gca gaa 96
Gln Lys Lys Lys Leu Glu Gly Gln Ile Ser Ala Arg Gln Gln Ala Glu
           20             25             30
gaa gct tca cag gag tca gaa aac gaa ctc aag gaa atg ata gaa acc 144
Glu Ala Ser Gln Glu Ser Glu Asn Glu Leu Lys Glu Met Ile Glu Thr
           35             40             45
ctt gct cgg aag ctg aat gag aaa tcc aaa gag caa atg gaa ctt cac 192
Leu Ala Arg Lys Leu Asn Glu Lys Ser Lys Glu Gln Met Glu Leu His
           50             55             60
cac cag aat ctg aat ctc caa gaa aca ctg aag aga gta gca aat tgt 240
His Gln Asn Leu Asn Leu Gln Glu Thr Leu Lys Arg Val Ala Asn Cys
           65             70             75            80
tca gct cct tgt ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac 288
Ser Ala Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr
           85             90             95
cta ttt tcc tcg ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc 336
Leu Phe Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys
           100            105            110
ttg tct ttg gat gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg 384
Leu Ser Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu
           115            120            125
gac ttc atc cag caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg 432
Asp Phe Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met

```

130 135 140
 ggg ctg tct cgg agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt 480
 Gly Leu Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly
 145 150 155 160
 tct cct ttg atg ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag 528
 Ser Pro Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln
 165 170 175
 aca tac cct tca ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat 576
 Thr Tyr Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr
 180 185 190
 gcg gaa aac tgc att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca 624
 Ala Glu Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala
 195 200 205
 aac cta aga gca cag 639
 Asn Leu Arg Ala Gln
 210

<210>2

<211>393

<212>DNA

<213>Homo sapience aortic endothelial cell

<400>2

cct tgt ccg caa gac tgg atc tgg cat gga gaa aac tgt tac cta ttt 48
 Pro Cys Pro Gln Asp Trp Ile Trp His Gly Glu Asn Cys Tyr Leu Phe
 1 5 10 15
 tcc tcg ggc tca ttt aac tgg gaa aag agc caa gag aag tgc ttg tct 96
 Ser Ser Gly Ser Phe Asn Trp Glu Lys Ser Gln Glu Lys Cys Leu Ser
 20 25 30

ttg gat gcc aag ttg ctg aaa att aat agc aca gct gat ctg gac ttc 144
 Leu Asp Ala Lys Leu Leu Lys Ile Asn Ser Thr Ala Asp Leu Asp Phe
 35 40 45
 atc cag caa gca att tcc tat tcc agt ttt cca ttc tgg atg ggg ctg 192
 Ile Gln Gln Ala Ile Ser Tyr Ser Ser Phe Pro Phe Trp Met Gly Leu
 50 55 60
 tct cgg agg aac ccc agc tac cca tgg ctc tgg gag gac ggt tct cct 240
 Ser Arg Arg Asn Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Trp Glu Asp Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 ttg atg ccc cac tta ttt aga gtc cga ggc gct gtc tcc cag aca tac 288
 Leu Met Pro His Leu Phe Arg Val Arg Gly Ala Val Ser Gln Thr Tyr
 85 90 95
 cct tca ggt acc tgt gca tat ata caa cga gga gct gtt tat gcg gaa 336
 Pro Ser Gly Thr Cys Ala Tyr Ile Gln Arg Gly Ala Val Tyr Ala Glu
 100 105 110
 aac tgc att tta gct gcc ttc agt ata tgt cag aag aag gca aac cta 384
 Asn Cys Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Cys Gln Lys Lys Ala Asn Leu
 115 120 125
 aga gca cag 393
 Arg Ala Gln
 130

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 におけるビオチン化細胞外領域、並びにビオチン化CTLDの発現状況を示す電気泳動像である。

【符号の説明】

A：ビオチン化細胞外領域

B：ビオチン化CTLD

レーン 1：不溶性画分

レーン 2：可溶性画分

【図 2】 実施例 2 におけるビオチン化細胞外領域、並びにビオチン化CTLDのリフォールディングの結果を示す電気泳動像である。

【符号の説明】

A：ビオチン化細胞外領域

B：ビオチン化CTLD

レーン 1：封入体

レーン 2：CTABの使用で可溶性画分に回収されたもの

レーン 3：CTABの使用で不溶性画分に回収されたもの

レーン 4：SB3-14の使用で可溶性画分に回収されたもの

レーン 5：SB3-14の使用で不溶性画分に回収されたもの

【図 3】 実施例 3 における表面プラズモン共鳴による変性LDLの検出結果を示すグラフ。

【符号の説明】

A：細胞外領域によるアセチル化LDLの検出結果を示す。

B：細胞外領域による酸化LDLの検出結果を示す。

C：CTLDによるアセチル化LDLの検出結果を示す。

D：CTLDによる酸化LDLの検出結果を示す。

【図 4】 実施例 4 における水晶発振子マイクロバランスによる変性LDLの検出結果を示すグラフ。

【符号の説明】

A：細胞外領域による酸化LDLの検出結果を示す。

B：CTLDによる酸化LDLの検出結果を示す。

【図 5】 実施例 4 における水晶発振子マイクロバランスによる細菌の検出結果を示すグラフ。

【符号の説明】

A：細胞外領域による大腸菌の検出結果を示す。

B：細胞外領域によるブドウ球菌の検出結果を示す。

【図 6】 実施例 4 における水晶発振子マイクロバランスによる細菌の検出結果を示すグラフ。

【符号の説明】

A：CTLDによる大腸菌の検出結果を示す。

B：CTLDによるブドウ球菌の検出結果を示す。

【図 7】 実施例 4 における水晶発振子マイクロバランスによるアポトーシス細胞の検出結果を示すグラフ。

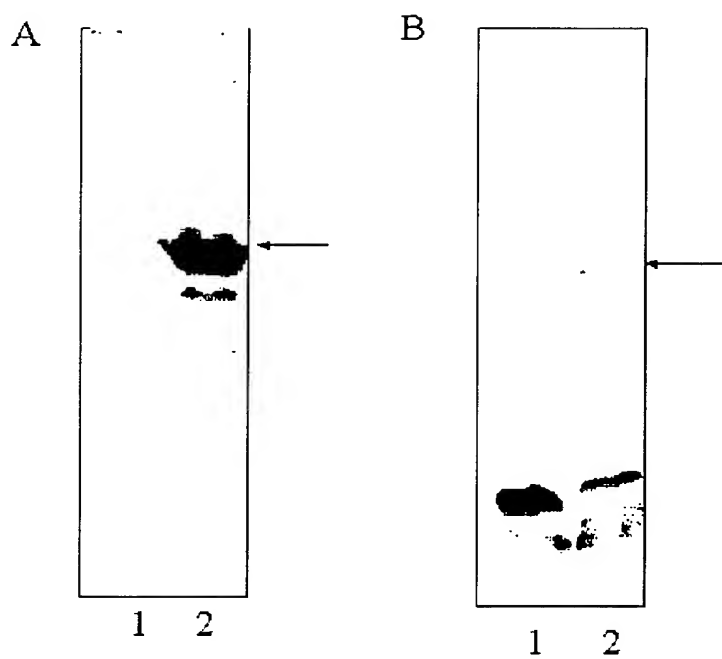
【符号の説明】

A：細胞外領域によるアポトーシス細胞の検出結果を示す。

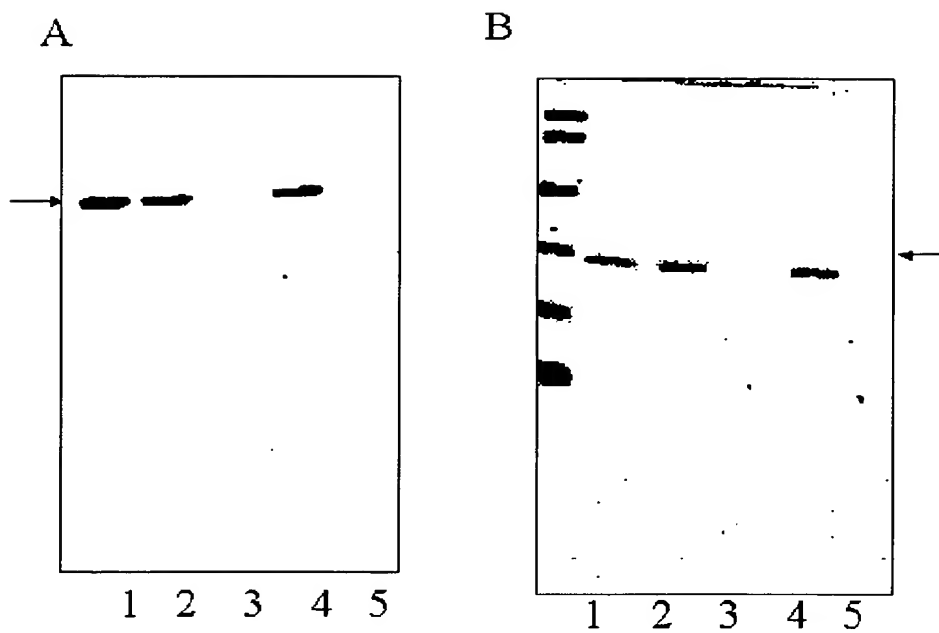
B：CTLDによるアポトーシス細胞の検出結果を示す。

【書類名】 図面

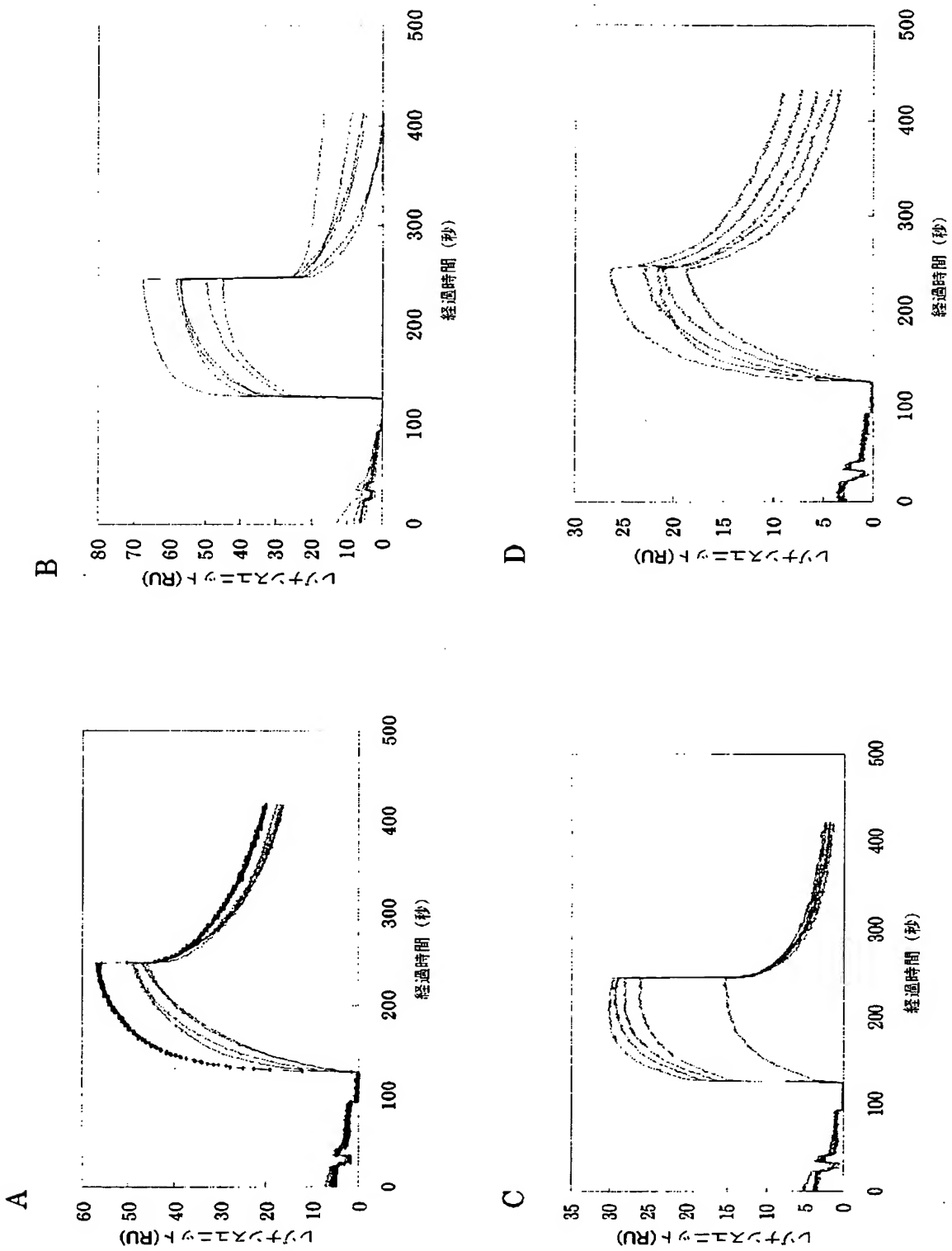
【図 1】



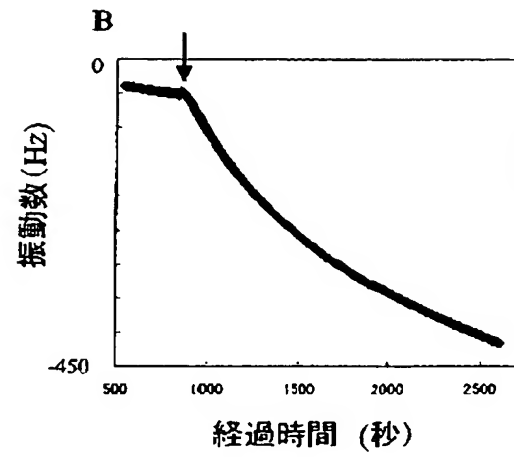
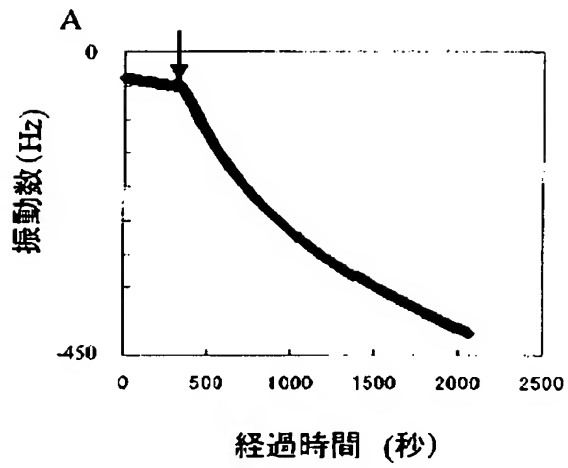
【図 2】



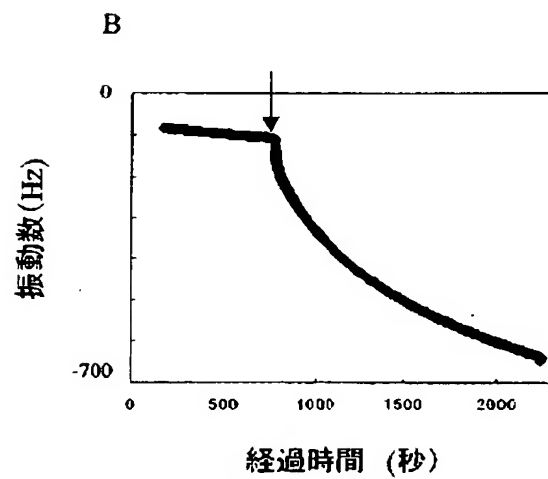
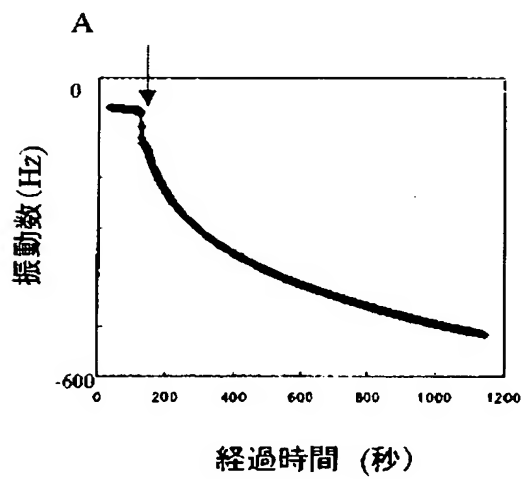
【図 3】



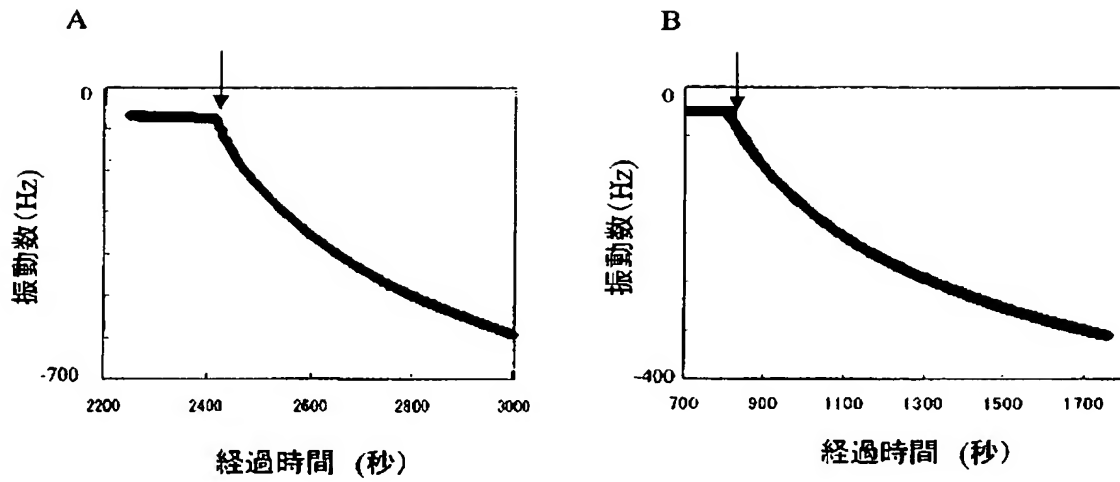
【図 4】



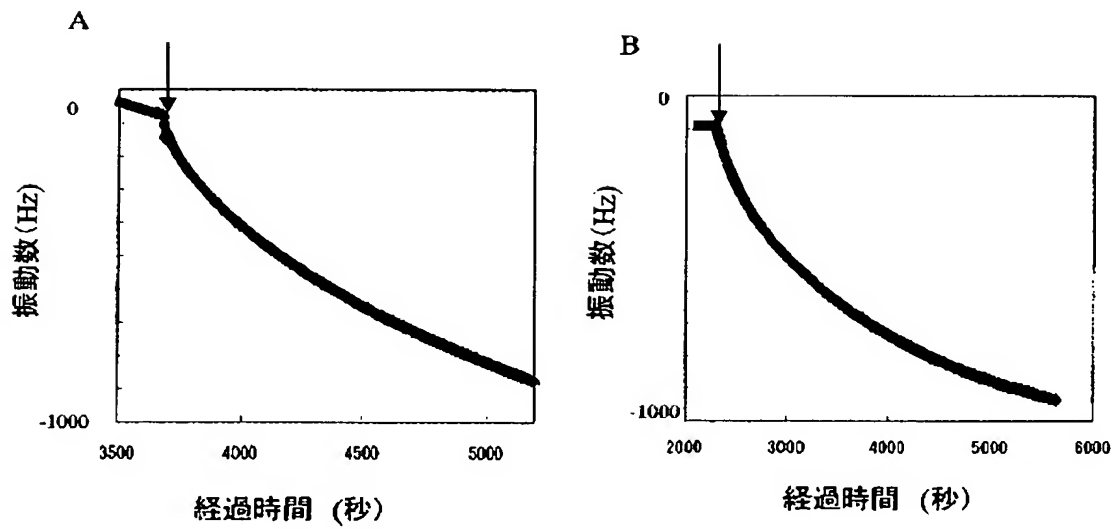
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 受容体のリガンド認識に関係する領域、例えば hLOX-1 の細胞外領域やCTLDを、リガンド結合能を有した可溶性のタンパク質またはビオチン化タンパク質として調製し、変性LDLや細菌を簡便に検出する方法を提供すること。

【解決手段】 受容体のリガンド認識に関係する領域をそのまま、あるいはビオチン化タンパク質として細胞もしくは試験管内で発現させた後、発現させた領域もしくは発現させたビオチン化タンパク質をアビジンまたはストレプトアビジンを介して方向性を保って固相上に固定化し、当該固定化タンパク質を用いることを特徴とする分子間相互作用解析法による変性LDL、異常細胞または細菌の検出方法並びに当該変性LDL等の検出用キット。

【選択図】 なし



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 5 6 6 9 1
受付番号	5 0 2 0 1 3 0 7 5 1 6
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 4 年 9 月 3 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年 9月 2日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 5 6 6 9 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 1 4 5 2 9 5]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

氏 名

独立行政法人 食品総合研究所